

PRODUCTION METHOD AND APPARATUS FOR TEST CHIP AND TEST CHIP

Patent Number: JP2002082121
Publication date: 2002-03-22
Inventor(s): NAKAJIMA KENJI
Applicant(s): FUJI PHOTO FILM CO LTD
Requested Patent: ☐ JP2002082121
Application Number: JP20010193061 20010626
Priority Number(s):
IPC Classification: G01N37/00; C12M1/00; C12N15/09; G01N1/00; G01N1/28; G01N33/53; G01N33/566
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method and an apparatus which achieve an easy production of test chips which are simple to handle in DNA analysis, immunological analysis and biological analysis or the like.

SOLUTION: In the method and apparatus for producing test chips to be used in the biological analysis of specimens, a solution containing a specific bond substance is fed intermittently or continuously into a flowing carrier liquid and the carrier liquid is sent in lines onto a base plate from a nozzle. The lines of the carrier liquid, containing the specific bond substance, are smeared onto the base plate and dried.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

BEST AVAILABLE COPY

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-82121

(P2002-82121A)

(43)公開日 平成14年3月22日(2002.3.22)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード(参考)
G 0 1 N 37/00	1 0 2	G 0 1 N 37/00	2 G 0 5 2
	1 0 3		1 0 2 4 B 0 2 4
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	1 0 3 4 B 0 2 9
C 1 2 N 15/09		G 0 1 N 1/00	A
			1 0 1 K
審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 7 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001-193061(P2001-193061)
 (22)出願日 平成13年6月26日(2001.6.26)
 (31)優先権主張番号 特願2000-190934(P2000-190934)
 (32)優先日 平成12年6月26日(2000.6.26)
 (33)優先権主張国 日本(J P)

(71)出願人 000005201
 富士写真フイルム株式会社
 神奈川県南足柄市中沼210番地
 (72)発明者 中島 賢二
 神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写真
 フイルム株式会社内
 (74)代理人 100085109
 弁理士 田中 政浩

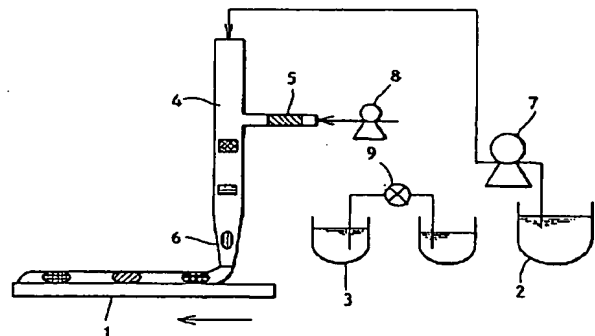
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 試験チップの製造方法、装置及び試験チップ

(57)【要約】

【課題】 DNA解析や免疫学的解析の生物学的解析等に際して簡単に扱うことができる試験チップを容易に製造する方法と装置を提供する。

【解決手段】 上記課題は、流通しているキャリア液に特異的結合物質を含有する液を間欠的又は連続的に送り込み、該キャリア液をノズルから基板上に線状に送り出して、該基板上に該特異的結合物質を含むキャリア液の線を塗設し、これを乾燥することを特徴とする、検体の生物学的解析に用いられる試験チップの製造方法と装置によって解決される。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 流通しているキャリア液に特異的結合物質を含有する液を間欠的又は連続的に送り込み、該キャリア液をノズルから基板上に線状に送り出して、該基板上に該特異的結合物質を含むキャリア液の線を塗設し、これを乾燥することを特徴とする、検体の生物学的解析に用いられる試験チップの製造方法

【請求項2】 特異的結合物質を含有する液を間欠的に送り込み、該基板上に該特異的結合物質が一定間隔をおいて配置されたキャリア液の線を塗設する請求項1記載の製造方法

【請求項3】 特異的結合物質を含有する液をノズルから基板上に線状に送り出して、該基板上に該特異的結合物質を線状に塗設し、これを乾燥することを特徴とする、検体の生物学的解析に用いられる試験チップの製造方法

【請求項4】 特異的結合物質がcDNAである請求項1記載の製造方法

【請求項5】 キャリア液を流通させる管と、該管にキャリア液を送り込む機構と、該管に接続され特異的結合物質を含有する液を間欠的又は連続的に送り出す機構と、該管の先端に設けられたノズルと、該ノズルから流出するキャリア液が塗設される基板を支持する支持部材と、該ノズル又は支持部材を移動させる移動機構よりなる試験チップの製造装置

【請求項6】 特異的結合物質を含有する液を流通させる管と、該管の先端に設けられたノズルと、該ノズルから流出する特異的結合物質を含有する液が塗設される基板を支持する支持部材と、該ノズル又は支持部材を移動させる移動機構よりなる試験チップの製造装置

【請求項7】 基板上にドット状の特異的結合物質が数珠つなぎ状に配置されている試験チップ

【請求項8】 特異的結合物質がドット毎に異なっている請求項7記載の試験チップ

【請求項9】 基板上に特異的結合物質が破線状に配置されている試験チップ

【請求項10】 破線が並列状に並べられた複数の線よりなり、特異的結合物質が各線毎に異なっている請求項9記載の試験チップ

【請求項11】 基板上に特異的結合物質が連続線状に配置されている試験チップ

【請求項12】 連続線が並列状に並べられた複数の線よりなり、特異的結合物質が各線毎に異なっている請求項11記載の試験チップ

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、DNA解析、免疫学的解析等に用いられる試験チップの製造方法および装置に関するものである。

【0002】

【従来の技術】近年、遺伝子工学分野における技術が急速に発展し、10万個にも及ぶと考えられているヒトゲノムの塩基配列を解読することを1つの目的とするヒトゲノムプロジェクトが展開されている。

【0003】一方、抗原抗体反応を利用する酵素免疫測定法や蛍光抗体法等が診断や研究のために利用され、また各種遺伝子疾患に影響を与えているDNAを探索する研究も進んでおり、その1つの方法としてマイクロアレイ技術が注目されている。

【0004】このマイクロアレイ技術は、既に解読されている互いに異なる既知の多数のcDNAがメンブレンフィルタやスライドガラス上にマトリックス状に高密度（数100μm以下の間隔）に予め塗布されたマイクロアレイチップ（DNAチップと称するものもある）を用いる技術であり、例えば、蛍光色素aで標識された健康者Aの細胞から取り出したDNA（生物体由来物質の一例）および蛍光色素bで標識された、遺伝子疾患を有する検体Bの細胞から取り出したDNAを、ビベット等でこのマイクロアレイチップに滴下して各検体のDNAと、マイクロアレイチップ上のcDNAとをハイブリダイズさせ、後にこのマイクロアレイチップ上の各cDNAに、各蛍光色素a、bを各別に励起する励起光を操作して各cDNAごとの各蛍光を光検出器で検出し、マイクロアレイチップ上における蛍光の発光位置に対応付けられたこの検出結果により、各検体のDNAがいずれのcDNAとハイブリダイズされているかを求め、両検体間でハイブリダイズされたcDNAを比較することにより、上記疾病により発現したDNAまたは欠損したDNAを特定する技術である。

【0005】ところで上記マイクロアレイチップは、上述したように極めて多数のcDNAがスライドガラス等上に塗布されたものであるが、その製造方法は、予め準備されている多数のcDNAの1つに針状の塗布チップを浸し、塗布チップの先端に付着したcDNAをスライドガラス上の所定の位置に点状に塗布し、その後、塗布チップを洗浄、乾燥させ、次の異なる種類のcDNAに浸してスライドガラス上の他の所定位置に塗布する、いわゆるスポッティングという操作を繰り返すことにより行うものである。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】ここでスライドガラス等に塗布すべきcDNAの種類は数万種類に及ぶこともあり、1つのマイクロアレイチップを製造するのに多大の時間を要している。このため、上記マイクロアレイチップの価格は非常に高価であり、上述したDNAの発現研究を促進するうえで、また免疫学的解析を利用したスクリーニングへの応用に際して障害となっている。

【0007】本発明は上記事情に鑑みなされたものであって、DNA解析や免疫学的解析等の生物学的解析に際して簡単に取り扱うことができる試験チップを容易に製

造する方法と装置を提供することを目的とするものである。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は上記課題を解決するべくなされたものであり、流通しているキャリア液に特異的結合物質を含有する液滴を間欠的に送り込み、該キャリア液をノズルから基板上に線状に送り出して、該基板上に該特異的結合物質が一定間隔をおいて配置されたキャリア液の線を塗設し、これを乾燥することを特徴とする、検体の生物学的解析に用いられる試験チップの製造方法と、キャリア液を流通させる管と、該管にキャリア液を送り込む機構と、該管に接続され特異的結合物質の液滴を間欠的に送り出す機構と、該管の先端に設けられたノズルと、該ノズルから流出するキャリア液が塗設される基板を支持する支持部材と、該ノズル又は支持部材を移動させる移動機構よりなる試験チップの製造装置によってかかる目的を達成したものである。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明における生物学的解析とは、たとえば、抗原抗体反応の高い特異性を利用した抗原または抗体を検出するような免疫学的測定法や、いわゆるハイブリダイゼーションを利用する遺伝子解析、遺伝子診断、ピオチン-アビジン法等の特異的結合を利用する解析等を意味する。

【0010】また、ハイブリダイズ、ハイブリダイゼーションとは一般にはDNA断片間で相補的塩基配列部分の2本鎖形成を意味するが、ここでは広く特異的結合までも含むものを意味している。

【0011】本発明の試験チップは、生物体由来物質たとえば抗体、抗原、基質、DNA、mRNA等を検体とするものであって、特にDNAが適切である。

【0012】本発明の試験チップに用いられる特異的結合物質は上記の検体と免疫的結合あるいはハイブリダイズ可能なものであり、たとえばホルモン類、腫瘍マーカー、酵素、蛋白質、核酸、抗体、抗原、これらとなり得る種々の物質等、さらに各種cDNA、mRNAを含む。特にcDNAが適切である。この特異的結合物質は担体に保持された形態のものでありうる。担体はゼラチン粒子、ポリスチレンラテックス等のポリマーラテックス、シリカゲル等の無機物粒子、等であり、保持は特異的結合物質と担体の間の共有結合、イオン結合、物理的吸着などによって行われる。

【0013】特異的結合物質は、通常は溶液あるいは分散液状態で基板に塗着される。溶媒としては、目的の特異的結合物質を溶解あるいは分散しうるものであって、特異的結合物質を分解あるいは変質させない条件で除去、好ましくは蒸発あるいは揮発させることができるものを用いる。特異的結合物質がDNAの場合や特異的結合物質が抗体の場合には、溶媒の例としては水が適当である。

【0014】キャリア液は、特異的結合物質を含む液滴を搬送するためのものであり、流れが栓流であるのがよく、特異的結合物質の溶液あるいは分散液と混ざり合わず、あるいは混ざり合う前に乾燥除去、すなわち少なくとも1分以上分相状態を維持し得るものが好ましい。

【0015】しかしながら、キャリア液と特異的結合物質の溶媒が同じ（例えば水）では、拡散は起こるが、流れが栓流であれば、混合に較べると拡散の物質移動速度はかなり小さいので実質的に混合は起こらない。キャリアは水に対する溶解度の小さい有機溶剤が好ましい。

【0016】このキャリア液は、特異的結合物質を分解あるいは変質させない条件で除去、好ましくは蒸発あるいは揮発させる液体のみよりなっているとしてもよく、これを溶媒として溶質を溶解した溶液であってもよい。

【0017】特異的結合物質を分解あるいは変質させない条件で除去、好ましくは蒸発あるいは揮発させる液体の例としては、ケトン類、エステル類などがあり、特異的結合物質の溶媒ほどよい親和性を有するものが好ましい。特異的結合物質の溶媒が水である場合、キャリア液としては、メチルエチルケトン、ジエチルケトン、酢酸エチル、酢酸ブチルが特に好ましい。

【0018】基板は、ガラス、陶板などの無機物質、蛍光を発しないポリオレフィンなどのポリマーなどが用いられる。又、ポリマー表面をガラスコーティングした複合体でもよい。基板の形状は、特異的結合物質が塗着される基板の表面が平滑である。

【0019】特異的結合物質はこの基板上にマトリックス状、ストライプ状等に配置される。マトリックス状、すなわち縦横の平行線の各交点上に特異的結合物質を配置する場合にはこの特異的結合物質はスポット（略円形）をしており、直径が50～1000μm程度、通常100～500μm程度、縦方向あるいは横方向での特異的結合物質の間隔は各中心点間で1～10mm程度、通常1～5mm程度である。一枚の基板に設けられる特異的結合物質のスポットの数は10～500個程度、通常50～100個程度である。ストライプ状の場合には、各線の幅が50～1000μm程度、通常100～500μm程度、各線の間隔各中心間（縁と縁の間）が1～10mm程度、通常1～5mm程度である。各線は連続線のほか断点のある破線であってもよい。

【0020】本発明の試験チップの製造装置は、キャリア液を流通させる管と、該管にキャリア液を送り込む機構と、該管に接続され特異的結合物質の液滴を間欠的に送り出す機構と、該管の先端に設けられたノズルと、該ノズルから流出するキャリア液が塗設される基板を支持する支持部材と、該ノズル又は支持部材を移動させる移動機構よりなる。

【0021】キャリア液を流通させる管にキャリア液は定速で送り込まれ、従って、キャリア液を送る機構には、通常は少量の液体を定速で送り出すポンプが使用さ

10

20

30

40

50

れる。この送液流量は $1 \sim 100 \mu\text{l}/\text{min}$ 程度であり、例えばプランジャーポンプ、等が使用される。しかしながら、キャリア液タンクを高所に設けて、その落差及びノズル出口と基板の間のキャリア液の表面張力を利用してキャリア液を引き出す形式をとることもできる。

【0022】該管内に送り出される特異的結合物質の液滴は1滴が $0.1 \sim 500 \text{ nl}$ 程度、通常 $1 \sim 100 \text{ nl}$ 程度の微量であり、これを送り出す機構としてはドージングバルブや微量のディスペンサー等が使用される。キャリア液供給管への特異的結合物質供給口は各特異的結合物質ごとに設けてもよく、あるいは複数の特異的結合物質の供給口をまとめて、各特異的結合物質を切替バルブで切り替えて供給するようにしてもよい。後者の場合、切替バルブから供給口の間で各液滴が混合しないよう液滴間にキャリア液を存在させることが好ましい。

【0023】特異的結合物質の各液滴がキャリア液流通管内で所定間隔で配置されるように各液滴が供給されるようにする。そのために、キャリア液の流速を測定する機構と、所定期間に所定の特異的結合物質の液滴を放出させるプログラムによるコンピュータ制御機構を設けることが好ましい。

【0024】キャリア液流通管の先端に設けられるノズルは口径が基板上に塗着されるキャリア液の線が設計幅になるようにされる。このノズル口は非常に小さいものになるのでノズルは針状のものであってもよい。

【0025】基板は支持部材によって支持される。この支持部材は、基板とノズル先端との間隔を一定に保つとともに、ノズルを固定した場合には基板を一定方向に一定速度で走行させるものである。ノズルの先端と支持部材で支持された基板との間隔は $0.1 \sim 5 \text{ mm}$ 程度、通常 $0.2 \sim 2 \text{ mm}$ 程度にされ、必要によりこの間隔は調整できるようにする。

【0026】上記のノズル又は基板支持部材の少なくとも一方は走行できるようにし、その走行速度は通常 $1 \sim 10 \text{ mm}/\text{sec}$ 程度である。

【0027】上記の基板上に塗着される、特異的結合物質の液滴がキャリア液によって数珠つなぎ状になった線は1本ずつ設けていってもよいが、製作効率上複数のノズルを並べて1回ないし数回の塗布で完了するようにすることが好ましい。

【0028】塗着が終了した基板の乾燥は特異的結合物質が分解あるいは変質しない条件下で行えばよく、例えば自然乾燥、風乾、減圧乾燥、凍結乾燥等が利用される。

【0029】本発明の試験チップの使用方法としては、従来のDNA解析、免疫学的解析の手法を利用できる。

【0030】例えば、基板上に所定の間隔で互いに異なる多数の既知の特異的結合物質がマトリックス状に配置されている試験チップに、所定の検体の、蛍光色素で標識された生物体由来物質をハイブリダイズせしめ、前記

生物体由来物質がハイブリダイズされた試験チップに前記蛍光色素を励起する励起光を照射し、前記励起光の照射により発光された蛍光を、前記試験チップ上における該蛍光の発光位置と対応付けて検出することにより、前記試験チップ上の特異的結合物質のうち、前記検体の生物体由来物質がハイブリダイゼーションされた特異的結合物質を特定する。

【0031】蛍光色素で標識された生物体由来物質をハイブリダイズせしめとは、現実にはハイブリダイズするかどうかを問わず、ハイブリダイズさせるための操作を行う意である。

【0032】励起光の照射と蛍光の検出は、励起光を帯状の試験チップの長手方向に相対的に一次元走査することにより、試験チップ上の各特異的結合物質を順次照射し、照射された特異的結合物質から発光する蛍光を順次検出するようにしてもよいし、少なくとも一次元状に広がる励起光で試験チップの全体を一時に均一に照射して、試験チップ上のハイブリダイズされている特異的結合物質から発光する蛍光を一次元状のCCD等を用いて一時に検出するようにしてもよい。しかし、後者では試験チップの長さに応じて励起光の照射範囲を広げるとともにCCD等による検出範囲も広げる必要性から装置構成が大型化するため、前者を採用するのが好ましい。なお、励起光を試験チップに対して相対的に一次元走査するとは、試験チップを固定して励起光を一次元状に走査してもよいし、励起光の照射範囲を固定して試験チップを一次元状に搬送してもよく、さらに、励起光を走査するときは光源自体を一次元状に移動させてもよいし、光源自体は固定し走査光学系によって一次元状に走査してもよいが、試験チップを一次元状に搬送するのが最も操作が簡単であり好ましい。以下の発明においても同様である。

【0033】発光された蛍光を、試験チップ上における蛍光の発光位置と対応付けて検出するとは、試験チップ上における蛍光が検出された位置を特定すること、すなわち蛍光を発した特異的結合物質を特定することと同義であり、励起光を上記したように試験チップに対して相対的に一次元走査する構成においては、蛍光の発光位置と対応付けるのに代えて、励起光の走査位置と対応付けようにしてもよい。

【0034】以下、本発明の実施態様を図面を用いて説明する。

【0035】図1は本発明の試験チップの一実施形態を示す図である。基板1の上にキャリア液2が線状に塗布され、そのキャリア液2の線中に、互いに異なる既知のcDNA（特異的結合物質として）3が、所定の間隔において、ドット状に塗布されている。このようなキャリア液2の線を多数本平行して塗布することで、多種類のcDNAがマトリックス状に配置された試験チップとなる。

【0036】図2は本発明の試験チップの製造方法及び装置の一実施態様を示す図である。

【0037】キャリア液2がポンプ7により一定の流量で流れるキャリア液流通管4の先端近傍に、ポンプまたはディスペンサー8によりcDNAを含む液体3が注入される特異的物質供給管5が設置されている。切替バルブ9の切り替えにより、種類が異なるcDNAを含む液体3がキャリア液2に注入される。管4の先端に、ノズル6が、基板1と間隔をおきキャリア液3の線を形成するように取り付けられる。基板1または管4のいずれかが、X-Yテーブルなどの手段により、相対的に移動することで、図1に示すような、cDNAのドットがマトリックス状に形成された試験チップが作成される。

【0038】基板1か管4を2方向に移動させてもよいし、基板1を一方方向に移動させ、管4を基板1の移動方向と直交する方向に移動させてもよい。また、管4を多数本配列して、基板1か管4を一方方向に移動させてもよい。

【0039】図3はcDNAを含む液体3が注入される特異的物質供給管5の一実施態様を示す図である。特異的物質供給管5の先端10が、キャリア液流通管4の中心まで延設されている。

【0040】本発明の別の実施態様である試験チップの製造方法及び装置の構成を図4に示す。この装置は、切替バルブを設ける代わりに、キャリア液流通管4に多数の特異的結合物質供給管を接続して各特異的結合物質液滴を個別にキャリア液に送り出すようにしたほかは図2の装置と同じである。

【0041】本発明のさらに別の実施態様である試験チップの製造方法及び装置の構成を図5に示す。この装置は、図2の装置において特異的結合物質の液をキャリア液流通管4に連続的に供給するようにしたものである。尚、この装置において、キャリア液流通管4、ポンプ7及びキャリア液2のタンクを除去して、そのかわりに特異的結合物質供給管5を延設するとともにその先端にノズルを設けて、特異的結合物質の液をキャリア液を用い

【0042】本発明の試験チップの例を図6～図8に示す。図6の試験チップは特異的結合物質が連続線状に配置されている例である。各線の特異的結合物質は同一であっても、全て異なっているかあるいは一部が異なっているか。図では各線ごとに互いに異なる特異的結合物質が配置されている。

【0043】図7の試験チップは特異的結合物質が破線状に配置されている例である。破線を構成している各短線の特異的結合物質は同一であっても、全て異なっているかあるいは一部が異なっているか。図では各線ごとに互いに異なる特異的結合物質が配置されている。

【0044】図8の試験チップは特異的結合物質がドット状に配置されている例である。各ドットの特異的結合

物質は同一であっても、全て異なっているかあるいは一部が異なっているか。図では各ドットごとに互いに異なる特異的結合物質が配置されている。

【0045】

【実施例】メチルエチルケトンキャリア液として、低流量ポンプ7により、流量が1秒間に20ナノリットルでキャリア液体を管4に送る。

【0046】cDNAを含む液体の管4への注入体積が100ナノリットルで1秒間隔でディスペンサー8によりキャリア液体が流れる管4に注入。

【0047】顕微鏡用のガラス板を超音波洗浄後、乾燥してポジショニングテーブルにより、2方向に移動が可能とする。

【0048】針6とガラス板1との間隔を0.1(mm)にして、ガラス板1を速度が1(mm/sec)でガラス板1の長手方向に移動する。

【0049】ガラス板1の表面に、1本のキャリア液体の線が形成できれば、次にガラス板1の長手方向と直交する方向に1mm移動し、再びガラス板1の長手方向に移動する。このプロセスを繰り返して、ガラス板1の表面に、ドット状のcDNAをマトリックス状に塗布した。

【0050】cDNAのドット形状は200(μm)の円形状であった。

【0051】

【発明の効果】本発明により、DNAチップ等試験チップを容易にかつ安価に製造することができる。

【0052】

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の製造方法で製造される試験チップの一例の平面図である。

【図2】 本発明の試験チップの製造方法及び装置の一例を模式的に示した図である。

【図3】 キャリア液流通管及びノズルの構造の一例を示す斜視図である。

【図4】 本発明の試験チップの製造方法及び装置の別の例を模式的に示した図である。

【図5】 本発明の試験チップの製造方法及び装置の別の例を模式的に示した図である。

【図6】 本発明の試験チップの一例の平面図である。

【図7】 本発明の試験チップの別の例の平面図である。

【図8】 本発明の試験チップの別の例の平面図である。

【符号の説明】

1…基板

2…キャリア液

3…特異的結合物質

4…キャリア液流通管

5…特異的結合物質供給管

(6)

特開2002-82121

9

10

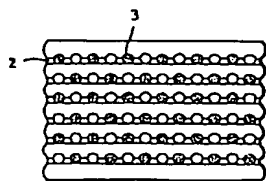
6…ノズル

* 8…ディスペンサー

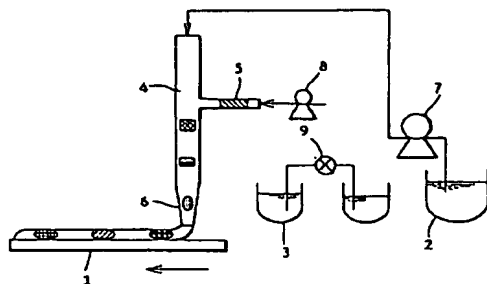
7…ポンプ

* 9…切替バルブ

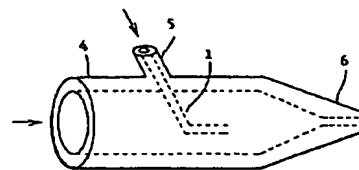
【図1】



【図2】

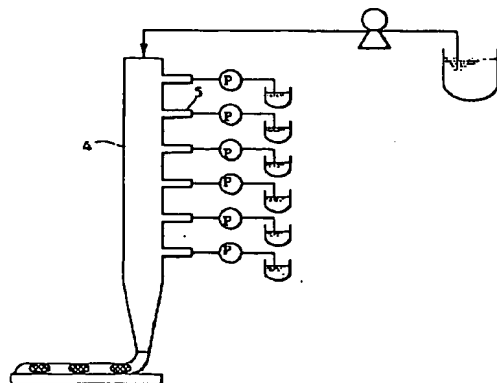


【図3】

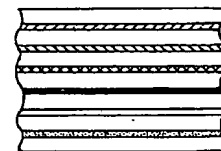
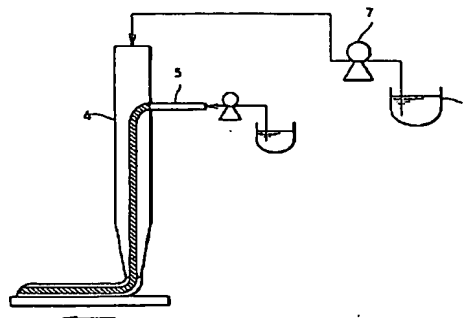


【図6】

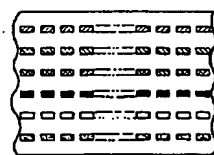
【図4】



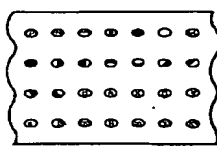
【図5】



【図7】



【図8】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

G 0 1 N 1/00
1/28
33/53
33/566

識別記号

1 0 1

F I

G 0 1 N 33/53
33/566
1/28
C 1 2 N 15/00

テーマコード (参考)

M
J
F

F ターム(参考) 2G052 AA28 AB16 AD26 AD46 CA02
CA03 CA12 CA21 CA22 CA29
CA40 DA05 FA05 FC09 FD18
GA11 GA29 HC04 HC09 HC29
HC33 HC39 HC40 JA04 JA07
4B024 AA11 AA20 CA04 HA12 HA19
4B029 AA07 AA21 AA23 BB20 CC08
FA03 FA12